

## Biodegradasi Phenantrene oleh Mikroba Laut M5 (*Alcanivorax Borkumensis*) yang Diisolasi dari Teluk Jakarta

Dyah Supriyati

Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Jl. Raya Cibinong KM 47 Cibinong Bogor

### ABSTRACT

#### **Biodiversity of Phenanthrene by *Alcanivorax borkumensis* M5 Isolated from Teluk Jakarta.**

Phenanthrene is one of the most persistent organic substances in environment. *Alcanivorax Borkumensis* M5 was isolated from sea water, and able to degrade phenanthrene after 5 hours. About 75 % of phenanthrene was degraded after 12 hours. This isolate grew optimum at 30°C, pH 7.8 with a doubling time of 14.5 hours and specific growth rate of 0.0476/hour. Polyhydroxybutyrate (PHB) was produced during culture growth, but the synthesis was inversely correlated with the cell growth. The relation between PHB synthesis and phenanthrene degradation is due required further investigation.

**Keywords:** Phenanthrene, degradation ,bacteria

**Kata kunci:** Phenantren, degradasi, bakteri

### PENDAHULUAN

Pencemaran lingkungan laut oleh minyak bumi, antara lain bisa disebabkan oleh tercecernya minyak bumi pada proses pengolahan, produksi, distribusi, maupun penggunaannya sehingga komponen-komponen minyak bumi terlepas ke dalam lingkungan..Salah satu komponen tumpahan minyak bumi yang berbahaya bagi ekosistem lingkungan laut adalah senyawa-senyawa *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) , yang merupakan salah satu senyawa karsenogenik (Cerniglia, 1984) yang sangat berbahaya bagi kesehatan manusia. Salah satunya adalah phenanthrene. Phenanthrene adalah senyawa *Polycyclic Aromatics Hydrocarbons* (PAH. yang tersusun dari gabungan tiga cincin benzena.

Menurut Brodkorb *et al.* 1992, frase phenanthrene merupakan gabungan dari senyawa alkil phenanthrene dan antrasen yang memiliki empat gugus karbon (tetrametil, dietil, metilpropil). Semua Phenanthrene  $C_{4n+2}$  memiliki tiga cincin benzena dan 1 gugus metil; maka, perlu dilakukan proses pembersihan terhadap tumpahan minyak bumi dengan teknik bioremediasi yaitu; biostimulasi dan bioaugmentasi. Peran bakteri indigenous akan sangat penting dalam proses biostimulasi.. Banyak penelitian ditujukan untuk mengetahui kemampuan mikroba untuk memecah senyawa PAH menjadi senyawa yang tidak berbahaya. *Cycloclasticus pugetti*, *Pseudomonas spp*, telah dilaporkan mampu memecah PAH terutama phenantrene menjadi senyawa karbon dioksida melalui alur degradasi yang sangat kompleks, yang

dikontrol oleh novel gen (Johnson & Karlson 2004; Lo'pez *et al.* 2006 ).

Mikroba laut juga dilaporkan berperan dalam hidrolisis senyawa PAH. karena memiliki metabolisme yang berbeda dengan mikroba teresterial, oleh karenanya mikroba laut banyak dieksplor kemampuannya dalam biokonversi senyawa berbahaya, termasuk pestisida. PAH memiliki sifat mudah berikatan dengan jaringan *lipolytic* sehingga mudah terakumulasi di dalam tubuh. Distribusi ekologi mikroba laut tergantung dari rentang toleransi pH, salinitas temperatur dan status nutrisi. Parameter lingkungan tersebut menentukan fisiologi dan aktivitas sel di lingkungan, sehingga aktivitas mikroba yang mampu mendegradasi phenantrene juga tergantung dari parameter lingkungan tersebut (Mulder *et al.* 2001; Uyttebroek *et al.* 2002). Mikroba laut dari marga *Spingomonas* umumnya memiliki distribusi ekologi yang sangat luas dari salinitas rendah (0%) sampai dengan salinitas tinggi (10%). Namun marga *Salipiger* kemungkinan mempunyai rentang distribusi ekologi yang lebih sempit dibandingkan dengan marga *Spingomonas* karena beberapa anggota dari marga *Salipiger* tidak dapat tumbuh pada salinitas 0%. Karakteristik ekologi dan fisiologi (terutama penggunaan sumber C yang berbeda dan aktivitas enzimatik) dari mikroba yang mampu mendegradasi PAH perlu diintensifkan untuk mendapatkan informasi yang dapat digunakan untuk memprediksi distribusi ekologi dari jasad renik yang berpotensi dimanfaatkan sebagai agen bioaugmentasi untuk limbah yang mengandung PAH.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui karakteristik mikroba laut yang mempunyai potensi sebagai agen bioaugmentasi untuk limbah yang mengandung phenantrene di dalam minyak bumi.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel penelitian ini diambil dari Teluk Jakarta. Letak astronomisnya adalah 106,6° BT dan 5,85° LS.

Bakteri potensial pendegradasi PAH diisolasi pada medium minimum ONR7a : per liter akuades) 22,79 gr NaCl, 11,18 gr  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 3,98 gr  $Na_2SO_4$ , 1,46 gr  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 1,3 gr TAPSO {3-[N-tris(hydroxymethyl)methylamino]-2-hydroxypropanesulfonic acid}, 0,72 gr KCl, 0,27 gr  $NH_4Cl$ , 89 mg  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ , 83 mg NaBr, 31 mg  $NaHCO_3$ , 27 mg  $H_3BO_3$ , 24 mg  $SrCl_2 \cdot 6H_2O$ , 2,6 mg NaF, dan 2,0 mg  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ . Untuk mencegah presipitasi selama proses sterilisasi dibuat 3 macam larutan yang terpisah dan dicampurkan setelah proses sterilisasi selesai (larutan mencapai temperatur 50°C). Larutan pertama mengandung NaCl,  $Na_2SO_4$ , KCl, NaBr,  $NaHCO_3$ ,  $H_3BO_3$ , NaF,  $NH_4Cl$ ,  $Na_2HPO_4$  dan TAPSO (sesuaikan pH hingga 7.6 dengan NaOH), larutan kedua mengandung  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ , dan  $SrCl_2$  (*divalent cation salts*), dan larutan ketiga mengandung  $FeCl_2$ . Untuk memadatkan media, Noble Agar (Difco) (15.0 gr/L) ditambahkan pada larutan pertama. Penambahan phenantrene di dalam media dilakukan menggunakan teknik sublimasi yaitu temperatur sublimasi 100°C dan waktu sublimasi 10 menit.

Mikroba yang tumbuh pada media ONR7a dan membentuk zona bening disekitar koloni adalah mikroba pengguna phenantrene. Mikroba yang memiliki zona bening selanjutnya di sub kultur pada media marine broth sebanyak 3 kali untuk mendapatkan biakan murni.

Setelah menemukan zona bening di sekitar biakan potensial yang telah terisolasi, secara aseptik inokulasikan biakan-biakan potensial tersebut kembali ke medium ONR7a. Inkubasi pada suhu normal selama 24-72 jam. Kemudian pindahkan bakteri potensial tersebut ke media minimum ONR7a kembali. Uji kemurnian biakan dengan menanamnya di medium kaya (contohnya: medium marine agar). Isolat yang sudah murni, disubkultur ke 5 ml medium cair ONR7 yang mengandung 5 mg kristal senyawa Phenanthrene.

Uji pertumbuhan biakan murni terseleksi pendegradasi phenantrene yang dilakukan dengan variasi tiga parameter fisik yaitu salinitas, temperatur dan pH. Biakan murni bakteri ditumbuhkan pada media air laut, dengan sumber karbon glukosa 5 gr/l dan yeast extract 0.5 gr/l. Salinitas  $\pm$  3,3% dan Salinitas 5% , suhu 30°C dan suhu 40°C, dan pH 7.8 dan 5.17. Kecepatan pertumbuhan diikuti dengan menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm, yang diukur setiap 4 jam.

Uji biodegradasi PAH Phenantrene dilakukan dengan mengamati perubahan konsentrasi total karbon phenanthrene selama selang waktu tertentu. Karena pengukuran total karbon dilakukan dalam fase cair, maka Phenanthrene harus

dapat dilarutkan ke dalam medium uji air laut. Phenanthrene dilarutkan dengan menggunakan DMSO sebanyak 10 % (V/V). Kecepatan degradasi diukur setiap 4 jam, dengan menggunakan GCMS (Harayama *et al.* 1999).

1 ml sampel di dalam appendorf, disentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Buang supernatan, timbang berat kering selnya.

Campurkan 1 ml sampel kultur dengan 1 ml pewarna Suddan Black B dengan menggunakan Vortex. Inkubasi selama 1 jam di suhu kamar. Amati dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm. Campuran tersebut kemudian disentrifuge kembali 5000 rpm selama 10 menit, kemudian ukur kembali supernatannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595nm. PHB yang terbentuk akan terikat di dalam sel, sehingga warna campuran berubah menjadi lebih bening. Selisih absorbansi pada panjang gelombang 595 nm sebelum dan sesudah disentrifuge itu adalah PHB yang terbentuk. Dengan membandingkan selisih absorbansi dengan standar PHB dengan OD 595 nm dapat diketahui besarnya mg PHB/ gr sel.

## HASIL

### Diversitas mikroba pendegradasi PAHs dari air laut

Panantrene merupakan senyawa PAHs yang persisten di lingkungan. Deteksi mikroba yang mampu mendegrnasi PAHs dilakukan menggunakan metoda sublimasi.

Terbentuknya zona bening pada koloni bakteri yang sedang tumbuh merupakan indikasi mikroba mampu menghidrolisis phenantrene. Diversitas mikroba pendegradasi phenantrene diperlihatkan pada Tabel 1.

Tabel 1 memperlihatkan bahwa isolat M5 mampu menghidrolisis phenantrene dengan cepat. Biak tersebut setelah dilakukan uji konfirmasi, ternyata tetap mampu menghidrolisis PAHs dengan cepat, yaitu zona bening terbentuk setelah 6 jam waktu inkubasi. Karena kemampuannya menghidrolisis phenantrene maka isolat tersebut dipilih untuk dipelajari karakter fisiologinya.

**Kecepatan hidrolisis phenantrene**

Kemampuan degradasi PAHs diuji pada medium ONR7a. Medium ini mengandung kebutuhan nitrogen dan posfat yang memadai untuk degradasi phenantrene.

Isolat M5 mampu menghidrolisis phenantrene setelah 4 jam waktu inkubasi, sekitar 75 % dari Phenantrene terdegradasi dalam waktu 12 jam. Selanjutnya kecepatan degradasi lambat (Gambar 1). Untuk mengetahui kemampuan adaptasi biak M5, selanjutnya dilakukan uji pertumbuhan

pada tingkat salinitas sekitar 3.3% dan-5 % .

**Identifikasi**

Tahapan dan hasil identifikasi biak terseleksi potensial pendegradasi PAH phenanthrene M5 dengan 16rDNA menyebutkan bahwa bakteri tersebut adalah :

*Alcanivorax borkumensis* strain PTG4-9 (98%).

**Uji pertumbuhan pada rentang salinitas**

**Variasi Salinitas**

Bakteri M5 mempunyai pola pertumbuhan yang sama ,pada salinitas 3.3% maupun 5 %. Bakteri baru tumbuh setelah 24 jam inkubasi. Pada salinitas 5% fase kematian sudah mulai terlihat setelah 36 jam inkubasi, sedsang pada salinitas 3.3% bakteri masih masih hidup stabil ( Gambar 2)

**Variasi suhu**

Bakteri M5 (*Alcanivorak berkumensis*) yang tumbuh pada media dengan suhu 40<sup>0</sup>C lebih cepat tumbuh (8 jam inkubasi) tetapi pertumbuhannya kurang bagus bila dibandingkan dengan yang tumbuh pada media dengan suhu

**Tabel 1.** Pengujian degradasi phenantrene terhadap mikroba laut

| No. | Kode Isolat | Kemampuan mendegrdasi | Radius zona bening | Karakter koloni             |
|-----|-------------|-----------------------|--------------------|-----------------------------|
| 1   | M5          | +++                   | 2 mm               | Warna kuning,               |
| 2   | M1          | -                     | -                  | Warna kuning kecoklatan     |
| 3   | M2          | -                     | -                  | Warna Putih, tumbuh cembung |
| 4   | M3          | -                     | -                  | Warna kuning,               |
| 5   | M4          | +                     | 1 mm               | Warna putih kekuningan      |

30°C. Pada suhu 30°C, bakteri terlihat tumbuh pada 24 inkubasi, dan pertumbuhannya relative lebih subur (Gambar 2)

### Variasi pH

Pola pertumbuhan bakteri M5 (*Alcanivorak berkumensis*) pada media dengan pH 7.8 dan 5.17 hampir sama, mulai terlihat tumbuh 24 jam setelah inkubasi, tetapi tumbuh lebih subur pada media dengan pH 7.8 (Gambar 2)

### Berat sel.

Produksi sel diukur pada biak yang tumbuh pada media dengan salinitas 3.3%, 5% dan pH 5.17. Dari ketiga sampel yang diukur berat selnya, produksi sel tertinggi dicapai biak M5 (*Alcanivorak berkumensis*) yang tumbuh pada media air laut dengan salinitas 3.3%, diikuti pada salinitas 5% dan pH 5.17 (Gambar 3).

### Produksi PHB

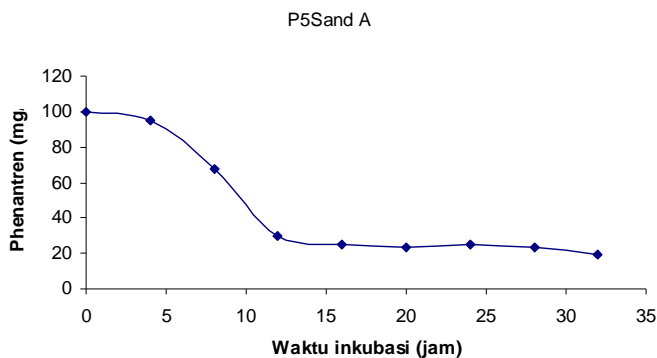
Produksi PHB terlihat berbanding terbalik dengan pertumbuhan bakteri.

Pada media dengan salinitas 3.3 % yang terlihat optimal untuk pertumbuhannya, sel membentuk PHB paling sedikit, begitu juga berikutnya produksi PHB oleh biak yang tumbuh pada salinitas 5 % dan yang tertinggi adalah produksi PHB oleh biak yang tumbuh pada pH 5.17 (Gambar 3).

## PEMBAHASAN

### Isolasi, Purifikasi, Uji Konfirmasi Biak Pendegradasi PAH dan Identifikasi

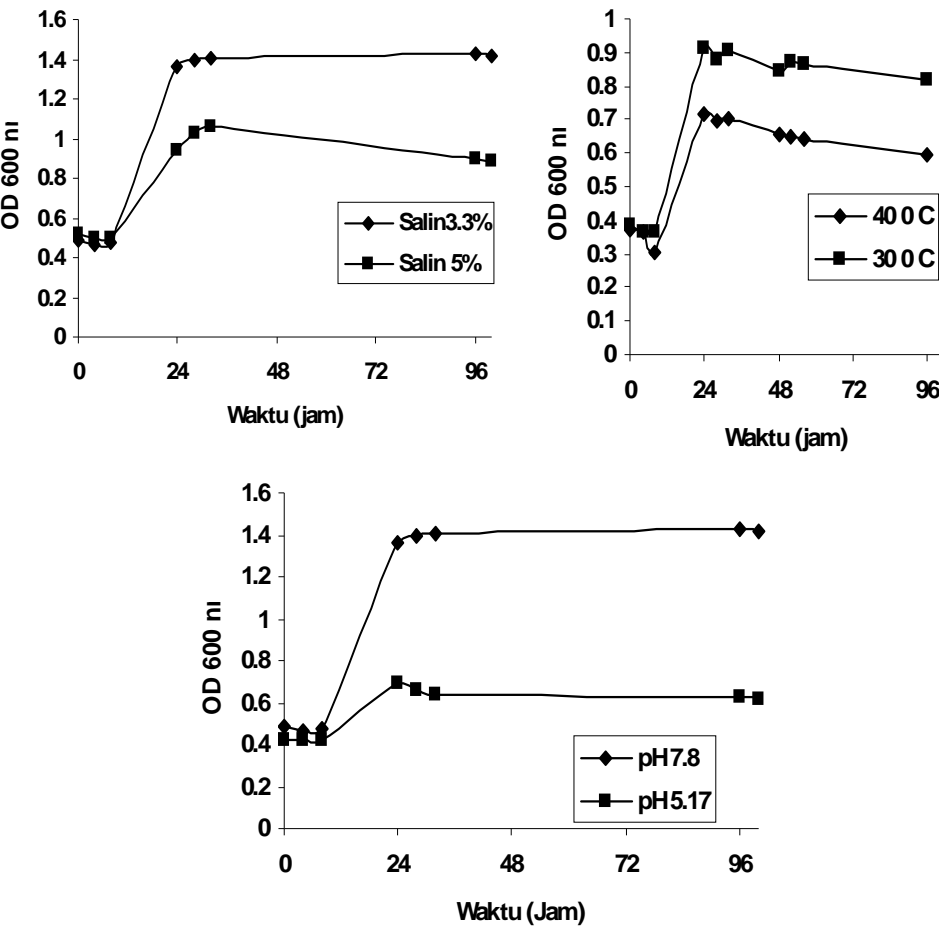
Zona bening yang kemudian diamati di sekeliling koloni bakteri adalah kondisi dimana telah menghilangnya kandungan PAHs phenantrene dari medium ONR7a, karena telah dihidrolisis oleh bakteri dalam metabolismenya. Pembentukan zona bening di sekeliling koloni bakteri yang tumbuh telah menunjukkan bahwa koloni bakteri tersebut dapat tumbuh dan mampu memanfaatkan senyawa PAHs Phenantrene sebagai sumber karbon dalam metabolismenya.



**Gambar 1.** Degradasi phenantrene oleh biak M5

**Tabel 2.** Persamaan linear waktu dengan Ln N untuk penentuan nilai  $\mu$  dan  $t_d$  dari pH 7.8 dan pH 5.17 pada *Alcanivorak borkumensis*

| pH/Suhu/Salinitas | Persamaan Linear penentuan $\mu$ | R2 Persamaan Linear | $\mu$ (jam <sup>-1</sup> ) | $T_d$ (jam) |
|-------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------|-------------|
| pH 7.8            | $Y = 0.0437x + 0.2273$           | $R^2 = 0.9704$      | 0.0437                     | 15.79       |
| pH 5.17           | $Y = 0.0143x + 0.3958$           | $R^2 = 0.9701$      | 0.0143                     | 48.25       |
| 30 °C             | $Y = 0.0369x + 0.302$            | $R^2 = 0.9459$      | 0.0369                     | 18.7        |
| 40 °C             | $Y = 0.018x + 0.3344$            | $R^2 = 0.8869$      | 0.018                      | 38.33       |
| Salinitas 3.3%    | $Y = 0.0476x + 0.3887$           | $R^2 = 0.9685$      | 0.0476                     | 14.5        |
| Salinitas 5%      | $Y = 0.0266x + 0.501$            | $R^2 = 0.9977$      | 0.0266                     | 25.94       |



**Gambar 2.** Pertumbuhan bakteri *Alcanivorak borkumensis* M5 pada media dengan salinitas suhu dan pH yang berbeda

### Uji Pertumbuhan dengan Variasi Salinitas, pH dan Temperatur

Bagi biak M5 (*Alcanivorax berkumensis*) pertumbuhan pada media dengan salinitas 3,3 % lebih baik dibandingkan dengan 5. Pada media dengan salinitas 3.3%, dengan  $t_d$  14.5 jam berarti bakteri mempunyai waktu generasi 14.5 jam. Artinya setiap 14.5 jam di salinitas 3.3% terbentuk dua sel baru hasil pembelahan biner dari sel induk bakteri M5. Nilai waktu generasi M5 ini lebih cepat, jika dibandingkan dengan waktu generasi bakteri M5 yang tumbuh pada Salinitas 5% (25.94 jam)

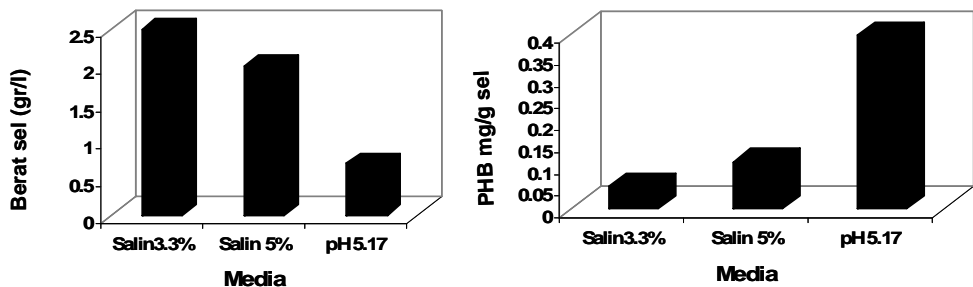
Pertumbuhan biak M5 (*Alcanivorax berkumensis*) pada media dengan suhu 30°C lebih baik dibandingkan dengan 40°C. Dengan  $t_d$  18.7 jam, bakteri mempunyai waktu generasi 18.7 jam.. Nilai waktu generasi M5 pada suhu 30°C ini lebih cepat, jika dibandingkan dengan waktu generasi bakteri M5 yang tumbuh pada Suhu 40°C (38.33 jam)

Biak M5 tidak dapat tumbuh baik pada media dengan pH rendah (5.17). Pada media dengan pH 7.8 bakteri M5 mempunyai  $t_d$  15.79 jam Nilai waktu

generasi M5 ini lebih cepat, jika dibandingkan dengan waktu generasi bakteri M5 yang tumbuh pada pH 5.17 (45.25jam)

Produksi sel terbanyak dicapai oleh biak M5 yang tumbuh pada media air laut dengan salinitas 3.3 %. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri ini tumbuh paling optimal pada salinitas 3.3 %. Sedangkan, secara umum bakteri dapat tumbuh dengan baik pada kisaran salinitas 1%-5%. Di salinitas 5%, pertumbuhan bakteri M5 mulai lemah. Dilihat dari sifatnya terhadap berbagai salinitas lingkungan perairan ini, bakteri ini bisa dikategorikan sebagai bakteri laut tropis. Hal ini menunjukkan bahwa, bakteri M5 adalah salah satu mikroba yang dapat berperan penting dalam proses biostimulasi pada biodegradasi kasus tumpahan minyak di lingkungan laut tropis, seperti misalnya di perairan laut Indonesia.

Dilihat dari 3 parameter di atas (waktu generasi, laju pertumbuhan, dan produksi sel), dapat ditarik kesimpulan bahwa bakteri M5 tumbuh baik pada kondisi temperatur, salinitas maupun pH yang serupa dengan asalnya.



**Gambar 3.** Produksi sel (kiri) dan PHB (kanan) bakteri *Alcanivorax borkumensis* M5 pada media air laut

### Degradasi Phenanthrene

Pada uji degradasi Phenanthrene ini, karena menggunakan rangkaian botol L yang berisi medium air laut steril terfiltrasi dan dilarutkan senyawa phenanthrene sebagai satu-satunya sumber karbon (tidak dilakukan penambahan sumber karbon lain) dengan konsentrasi 100 mg/L.. Media *seawater* ini dipilih karena menurut Springael, 2006 *recovery* bakteri laut pada penanaman menggunakan medium *seawater* ini adalah berkisar 2 – 60%, dimana lebih tinggi dari yang didapat dengan medium konvensional (kurang dari 0,1%). Dengan tumbuhnya bakteri M5 tersebut, pada media air laut mengandung phenanthrene, menunjukkan bahwa bakteri tersebut dapat memanfaatkan sumber karbon hanya dari phenanthrene.

### Produksi PHB

PHB (polyhydroxybutyrate) merupakan salah satu senyawa penting yang berperan sebagai elektron aseptor (Anderson & dawes, 1990) pada proses anaerobik-aerobik, dan nampaknya senyawa ini juga berperan pada proses degradasi phenanthrene. Pada media yang relatif optimum untuk pertumbuhannya, bakteri M5 justru sel membentuk PHB paling sedikit. Pada media dimana pertumbuhan bakteri M5 terlihat terhambat, sel justru membentuk PHB lebih banyak. Kemungkinan peran PHB pada degradasi phenanthrene perlu penelitian lebih lanjut.

### KESIMPULAN

*Alkanivorax borkumensis* M5 merupakan mikroba laut yang berperan dalam degradasi phenanthrene, tumbuh optimum pada salinitas 3,3 % , suhu 30°C dan pH mendekati netral (7.8). Kemungkinan isolat M5 mampu membentuk PHB, yang berperan pada proses degradasi phenanthrene, perlu diteliti lebih lanjut.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Dr. Made Sudiana, atas bantuan yang diberikan hingga selesainya tulisan ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, A.J. & E A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54:450–472.
- Brodkorb, TS. & R L. Legge. 1992. Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3117–3121.
- Cerniglia, CE. 1984. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv. Appl. Microbiol.* 30:31–71.



- Harayama, S., H. Kishira, Y. Kasai & K. Shutsubo. 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1:63–70
- Johnsen, AR.&U. Karlson. 2004. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:452–459.
- Lo´pez, Z, J. Vila, C. Minguillo´n & M. Grifoll. 2006. Metabolism of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. strain AP1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70:747–756.
- Mulder, H., AM. Breure & WH. Rulkens. 2001. Prediction of complete bioremediation periods for PAH soil pollutants in different physical states by mechanistic models. *Chemosphere* 43:1085–1094.
- Springael. 2006. Distribution of the *Mycobacterium* community and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) among different size fractions of a longterm PAH-contaminated soil. *Environ. Microbiol.* 8:836–847.
- Uyttebroek, MP. Breugelmans, M. Janssen, P. Wattiau, B. Joffe, U. Karlson, JJ. Ortega-Calvo, L. Bastiaens, A. Ryngaert, M. Hausner, D. Johnsen, ARK. Bendixen, & U. Karlson. 2002. Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates using the respiration indicator WST-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2683–2689.

**Memasukkan:** Agustus 2009

**Diterima:** September 2009